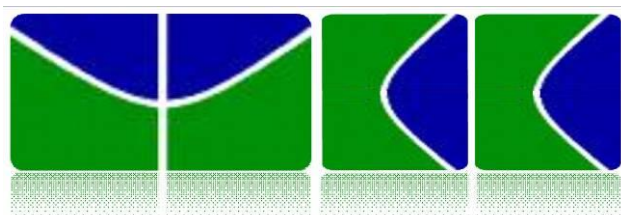


Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso

Licenciatura em Ciências Naturais



**Obtenção de mamoeiro (*Carica papaya L.*)
resistente à mancha anelar e à meleira através de
transformação genética via biobalística e
embriogênese somática**

Franciele Boff

Orientador: Dulce Rocha

Co orientador: Glaucia Barbosa Cabral

Universidade de Brasília

Faculdade UnB Planaltina

Junho 2014

RESUMO

O Mamoeiro é uma das árvores frutíferas das importantes cultivadas em países tropicais e subtropicais. No Brasil os maiores estados produtores são Bahia e Espírito Santo. O desenvolvimento da cultura do mamoeiro tem sido limitado principalmente devido às viroses da mancha anelar e da meleira. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de plantas de mamoeiro resistentes a essas viroses, utilizando embriogênese somática e transformação genética via biobalística tendo como explantes iniciais embriões zigóticos imaturos e embriões somáticos primários.

Palavras-chave: PRSV, PMeV, embrião zigótico imaturo, resistência a herbicida, glifosinato de amônio, RNAi, silenciamento gênico.

ABSTRACT

The Papaya is one of the important fruit trees grown in tropical and subtropical countries. In Brazil the largest producing states are Bahia and Espírito Santo. The development of the papaya crop has been limited mainly due to the ringspot viruses and meleira. This study aimed to obtain papaya plants resistant to these viruses, using somatic embryogenesis and genetic transformation via biolistic having as initial explants immature zygotic embryos and primary somatic embryos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta tropical que produz frutos o ano inteiro (TRINDADE, 2000). O mamoeiro pertence à família Caricaceae (RAMASWAMY *et al.*, 2010), sendo classificada em seis gêneros e 35 espécies (PEREIRA *et al.*, 2009).

Variedades de mamoeiro do grupo Solo dominam os plantios comerciais no mundo (CARMO, 2003), e seus frutos são ricos em vitamina A, vitamina C, cálcio (TRINDADE, 2000), ferro, potássio e tiamina (MING *et al.*, 2008). Os frutos, caules, folhas e raízes do mamoeiro são utilizados em grande variedade de aplicações médicas, incluindo a produção de papaína, que é uma enzima proteolítica com diversos usos na indústria alimentícia e cosmética (MING *et al.*, 2008).

O mamoeiro possui caule cilíndrico, com 10 a 30 cm de diâmetro, de coloração verde-clara no ápice e verde acinzentada na base, suas folhas são grandes variando de 20 cm a 60 cm. As flores podem ser classificadas em três tipos: flor pistilada ou feminina típica, flor hermafrodita e flor estaminada ou masculina típica. O fruto apresenta forma variada de acordo com o tipo de flor, a casca é fina e lisa, de coloração amarelo-clara a alaranjada, as sementes são pequenas, redondas, rugosas e recobertas por uma camada mucilaginosa (NÚCLEO DE ESTUDO EM FRUTICULTURA NO CERRADO, 2014). Existem várias formas de propagação do mamoeiro: através de estacas, enxertia, sementes ou utilizando técnicas de cultura *in vitro*. Utilizando essas técnicas de cultura *in vitro* as plantas são regeneradas através da embriogênese somática ou organogênese, ambas gerando mudas com padrão de alta qualidade (LIMA, 2003).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de frutas (FAO, 2013) e o segundo maior produtor quando se trata de mamão, ficando atrás apenas da Índia, seguido por Indonésia e República Dominicana. O Brasil possui uma área de plantio de mamão em torno de 36 mil hectares, tendo um volume de produção de aproximadamente 1.854.343 toneladas (ton) de frutos, sendo que o volume de exportação foi de 26.130.743 quilos em 2012 (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2013). No Brasil, o Nordeste é a principal região produtora de mamão, chegando a 22.331 ha de plantio e uma produção de 1.174.510 ton de frutos por ano. Já os principais estados produtores são Bahia e Espírito Santo que possuem uma produção anual de 928.035 ton e 560.576 ton, respectivamente (IBGE, 2011).

A produção mundial de mamão é afetada principalmente devido às viroses, sendo que no Brasil as principais viroses desta cultura são causadas pelo vírus da mancha anelar (*Papaya Ringspot Virus* - PRSV) e pelo Papaya meleira vírus (PMeV) que é o agente que causa a meleira (LIMA *et al.*, 2001).

Existem duas estirpes distintas do PRSV, o PRSV-W que infecta a família das Curcubitaceae e o PRSV-P que infecta as famílias das Curcubitaceae e Caricaceae. O PRSV é considerado uma das doenças mais destrutivas do mamoeiro, pois é fator limitante na produção. As plantas apresentam manchas alongadas e suas folhas apresentam mosaico e podem também apresentar intensas deformações e bolhas. A planta infectada produz em média 70% menos frutos do que uma planta sadia, e

seus frutos pesam cerca de 20% menos. A disseminação do vírus ao longo do pomar é rápida. O vírus pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* (REZENDE *et al.*, 1997).

A meleira causa em média 20% de perdas da produção, porém quando medidas de prevenção não são aplicadas a perda pode chegar a 100% da produção. Os frutos das plantas infectadas expõem látex pelos frutos de forma espontânea ou provocada por ferimentos. Ao contato com o ar, esse látex sofre oxidação e fica escuro gerando um aspecto “melado” nos frutos (VENTURA *et al.*, 2004).

Os esforços no sentido de desenvolver um mamoeiro transgênico resistente ao PRSV começou logo após a publicação de trabalhos nos quais foram obtidas plantas de *Nicotiana tabacum* transgênicos resistentes ao vírus do mosaico (GONSALVES, 2004).

O Havaí sofreu grandes perdas na produção de mamão devido ao vírus PRSV no início da década de 90, tendo sido feitas várias tentativas para contenção do vírus. A medida mais eficiente foi o desenvolvimento de um mamoeiro transgênico resistente ao vírus PRSV que foi denominado de 55-1. Este mamoeiro transgênico foi obtido através de bombardeamento de partículas de embriões zigóticos das cultivares “Sunrise”, “Sunset” e “Kapoho”. A partir de 1999, após as sementes do mamão transgênico resistente ao PRSV serem distribuídas para os fruticultores da região, as colheitas foram restabelecidas, demonstrando um excelente desempenho em condições de campo, e a região voltou a produzir mamão de forma sustentável (GONSALVES, 2004).

Plantas transgênicas expressando a via de silenciamento de RNA foram obtidas, visando alto nível de tolerância à infecção viral. Este caminho mimetiza uma estratégia natural e especializada ao nível molecular que as plantas usam para combater os vírus (RODRIGUES *et al.*, 2009).

RNA interferente é umas das estratégias da engenharia genética utilizadas atualmente para o desenvolvimento de plantas resistentes. O RNAi é um processo de silenciamento que é causado por um mecanismo pós-transcricional em que o gene o qual é normalmente transcrito dentro da célula, porém não consegue ser traduzido, pois é degradado antes (BARBOSA & LIN, 2004).

CAI (1999) usa metodologia de biobalística para transformação genética de tecido embriogênico de *Carica papaya L.* da cultivar “Sunrise” para obtenção de

resistência ao PRSV que se mostrou eficiente. Neste trabalho foi utilizado como agente seletivo a canamicina. Embriões somáticos de mamão eram macerados antes do processo de biobalística em papel filtro a fim de sincronizar a idade do explante e induzir crescimento celular rápido.

A embriogênese somática é um processo em que uma célula ou pequeno grupo de células somáticas têm a capacidade de regenerar embriões somáticos e a partir destes uma planta inteira (ZIMMERMANN, 2010). Para a indução de embriogênese somática em culturas *in vitro* vários reguladores de crescimento vegetal dentro das classes das auxinas e citocininas podem ser utilizados; a auxina mais amplamente usada é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que é utilizado no meio de cultivo por um curto período de tempo, que varia de acordo com a espécie que está sendo cultivada (PASTERNAK *et al.*, 2002).

Em outro trabalho, frutos da cultivar CO7 foram utilizados após diferentes períodos a partir da polinização para determinar em qual fase de desenvolvimento os embriões zigóticos teriam melhor resposta morfogênica na cultura de tecidos. Foram utilizados frutos com 80, 100, 120, 140 e 150 dias após a polinização das flores femininas. Embriões de frutos de 140-150 dias não formaram calos embriogênicos, enquanto que embriões de frutos de 100 dias apresentaram-se transparentes rodeados por um líquido leitoso, que também não produziu calos. Embriões zigóticos retirados de sementes brancas de frutos de 110-120 dias apresentaram melhores resultados para a indução de calos embriogênicos (RAMASWAMY *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Obter plantas de *Carica papaya* L. resistentes aos dois principais vírus da cultura (PRSV e PMeV).

- Objetivos específicos

Desenvolver metodologias de embriogênese somática e transformação genética via biobalística usando embriões zigóticos imaturos e embriões somáticos primários como explantes iniciais para resistência os vírus PRSV e PMeV.

MATERIAL E MÉTODOS

- Material vegetal:

Frutos imaturos de mamão, variedade Sunrise Solo, com 90 a 120 dias após a polinização (DAP) (RAMASWAMY *et al.*, 2010) foram gentilmente enviados pela equipe da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA para a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

- Vetor utilizado no bombardeamento:

Foram utilizados dois vetores, o vetor contendo o gene *gus* pBI426, foi utilizado na primeira fase da pesquisa para testar a eficiência do bombardeamento. Após essa fase foi utilizado o pAPRNAi2.

O plasmídeo pAPRNAi2 contém o cassete de RNAi para os vírus PMeV e PRSV e também contém o gene de seleção *bar* que codifica para a enzima PAT que confere resistência ao herbicida glifosinato de amônio (GA), utilizado para selecionar as células transformadas.

- Desinfestação das sementes:

Frutos imaturos com 90 a 120 dias após a polinização foram lavados superficialmente com detergente, seguido de hipoclorito de sódio (NaClO) 2% e posteriormente foram secos em papel absorvente, após o qual foram levados para a câmara de fluxo laminar, onde foram flambados com álcool comercial. Após esse processo, o fruto foi aberto com faca autoclavada, e as sementes foram coletadas em um recipiente de vidro autoclavado (Figura 1). Para desinfestar as sementes foi adicionado etanol 70% por 5 minutos sob agitação manual, e após ser retirado o etanol foi acrescentado hipoclorito de sódio (NaClO) 2% por 25 minutos, após o qual as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada por 3 vezes. Após o procedimento de desinfestação, os embriões zigóticos foram retirados das sementes com auxílio de microscópio estereoscópico, pinça e bisturi.



Figura 1: Fruto da variedade Sunrise Solo, aberto em placa de Petri grande após procedimento de lavagem externa em ambiente asséptico para coleta de sementes.

- Indução de embriogênese somática:

Após a desinfestação, embriões zigóticos isolados foram inoculados no meio de indução de embriogênese somática que consiste de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com $\frac{1}{2}$ sais de MS suplementado com vitaminas de mamão (Glutamina 400 mg/L, Mio-inositol 50 mg/L, Tiamina 0,4 mg/L, Glicina 2 mg/L, Ácido Nicotínico 0,5 mg/L e Piridoxina 0,5 mg/L), sacarose 6%, 2,4-diclorofenoxiacético 10 mg/L, ágar 0,8% e pH 5,8. Os embriões foram posicionados de tal forma que a raiz ficasse estabelecida no meio de cultura em placas de Petri, que foram incubadas no escuro em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C por três semanas para embriões zigóticos imaturos (i) e seis a oito semanas para embriões somáticos primários (ii).

- Bombardeamento de embriões zigóticos imaturos (i) e de embriões somáticos primários (ii):

Embriões zigóticos imaturos (i) induzidos para embriogênese somática foram posicionados de pé com o meristema apical o mais exposto possível, no meio de cultura, dispostos em círculo evitando a região de morte no centro da placa de vidro para bombardeamento. Embriões somáticos primários (ii) induzidos em embriões zigóticos imaturos também foram posicionados da mesma forma, ambos os tipos de explantes foram inoculados no meio de indução de embriogênese somática com fitagel 0,7%, sem adição de ágar.

Para o bombardeamento de ambos os tipos de explantes foram utilizadas micropartículas de tungstênio M5 que foram lavadas e desinfestadas

superficialmente com etanol 70% durante 15 min no agitador e depois centrifugadas a 13.000 rpm por cinco minutos, quando foi removido e descartado o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta; tendo sido adicionado 1mL de água destilada estéril e novamente foi misturada no agitador tipo vortex e depois submetidas a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido por mais duas vezes. Após a última lavagem foi descartado o sobrenadante e as micropartículas foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 50%. Em um tubo de centrífuga do tipo Eppendorf foi acrescentado na seguinte ordem: micropartículas 50 µl, Cloreto de Cálcio (CaCl_2 0,37 g/L) 50 µl, espermidina (0,014 g/L) 20 µL. O tubo foi colocado no sonicador por 10 minutos em velocidade baixa e centrifugado 15 segundos, então foi retirado o sobrenadante e adicionado 150 µL de etanol absoluto, as partículas foram ressuspensas e então repetiu-se o processo de centrifugar por 15 segundos, retirar o sobrenadante, adicionar 150 µL de etanol absoluto e ressuspender as micropartículas por mais duas vezes. A seguir foi retirado o sobrenadante e acrescentado 24 µL de etanol absoluto e sonicado por 2 segundos. Após foi precipitado sobre cada membrana carreadora 3,2 µL dessas micropartículas com DNA e então as membranas carreadoras juntamente com os discos de bombardeamento foram deixadas no dissecador durante 10 minutos.

Cada placa recebeu dois tiros, sendo cada tiro com uma precipitação de DNA. Os embriões permaneceram neste meio por um dia e então foram repicados para o meio de indução de embriogênese somática contendo 2,4-diclorofenoxiacético 5 mg/L, Timetin 50 mg/L, Cefotaxima 100 mg/L, Benlate 0,5 mg/L, glifosinato de amônio 5 mg/L. Os embriões foram dispostos, 10 por placa, e permaneceram neste meio por 8 a 12 semanas, até o desenvolvimento de embriões somáticos em forma de torpedo.

- Regeneração de explantes após bombardeamento de embriões zigóticos imaturos (i):

Embriões zigóticos imaturos formaram embriões somáticos em forma de torpedo e então foram repicados para meio de maturação que é composto por sais de MS, vitaminas de mamão (Glutamina 400 mg/L, Mio-inositol 50 mg/L, Tiamina 0,4 mg/L, Glicina 2 mg/L, Ácido Nicotínico 0,5 mg/L e Piridoxina 0,5 mg/L), sacarose 6%, Timetin 50 mg/L, Cefotaxima 100 mg/L, Benlate 0,5 mg/L, glifosinato de amônio 5

mg/L, ágar 0,8% e pH 5,8. Esse material permaneceu em meio de maturação por quatro semanas na presença de luz a 25 ± 2 °C.

Após esse período, os materiais vegetais foram repicados para meio de germinação que é composto por MS, Caseína 0,3 mg/L, Tiamina 1 mg/L, sacarose 3%, Cinetina 0,1 mg/L, BAP 0,2 mg/L, Timetin 50 mg/L, Cefotaxima 100mg/L, Benlate 0,5mg/L, Carvão Ativo P.A. 1 mg/L, ágar 1% e pH 4,0.

Quando o material vegetal começou a adquirir coloração verde escuro e formar folhas foram repicados para meio de enraizamento composto por ½ de MS, Mio-inositol 50 mg/L, Tiamina 0,1 mg/L, sacarose 1,5%, Timetin 50 mg/L, Cefotaxima 100mg/L, Benlate 0,5mg/L, ágar 0,8% e pH 5,8.

- Regeneração de explantes após bombardeamento de embriões somáticos primários (ii):

Embriões somáticos primários bombardeados foram transferidos para meio de maturação quando os embriões somáticos secundários atingiram o estágio de torpedo, onde permaneceram por oito semanas na presença de luz a 25 ± 2 °C.

Após este período os embriões foram repicados para meio de brotação composto por MS, Mio-inositol 100 mg/L, Tiamina 1 mg/L, sacarose 3%, Cinetina 0,1 mg/L, BAP 0,2 mg/L, Caseína 0,3 mg/L, Timetin 50 mg/L, Cefotaxima 100 mg/L, Benlate 0,5 mg/L, GA₃ 1 mg/L, AIA 1 mg/L, ágar 0,8% e pH 5,8.

Após 3 a 4 semanas o material foi transferido novamente para meio de maturação onde permaneceram durante 8 semanas. Após esse período o material foi repicado para meio de germinação.

Quando o material vegetal começou a adquirir coloração verde escuro e formar folhas foram repicados para meio de enraizamento que é composto por MS ½, Mio-inositol 50 mg/L, Tiamina 0,1 mg/L, sacarose 1,5%, Timetin 50 mg/L, Cefotaxima 100 mg/L, Benlate 0,5 mg/L, ágar 0,8% e pH 5,8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Indução de embriogênese somática

Observou-se que frutos de mamão com menos de 90 dias após a polinização apresentavam embriões transparentes, que ao serem cultivados em meio de indução apresentavam baixa taxa de morfogênese, permanecendo paralisados no meio de indução de embriogênese somática. Similar aos resultados encontrados por Ramaswamy et al., (2010). Frutos com mais de 120 dias após a polinização apresentavam sementes escuras e rígidas, sendo difícil a retirada dos embriões intactos. Embriões coletados de frutos com 90 a 120 dias após a polinização apresentaram indução de embriogênese somática na região do meristema apical (Figura 2) em quase 100% dos explantes.



Figura 2: Embrião zigótico imaturo de mamão cultivado em meio de indução de embriogênese somática com 2,4D com morfogênese (seta) na região do meristema apical.

- Eficiência biobalística

Embriões zigóticos imaturos (i) induzidos e bombardeados com plasmídeo para testar o uso potencial dos explantes com o gene *gus* formaram embriões somáticos primários na região do meristema apical. Enquanto embriões somáticos (ii) bombardeados também com o plasmídeo com gene *gus* originaram embriões somáticos secundários. Ambos explantes foram induzidos em 2,4-D e submetidos ao teste do X-Gluc após bombardeamento. A maior parte dos embriões zigóticos

imaturos (i) quanto embriões somáticos (ii) expressaram a coloração azul no teste do X-Gluc assim mostrando que o gene foi inserido com sucesso no explante (figura 3).

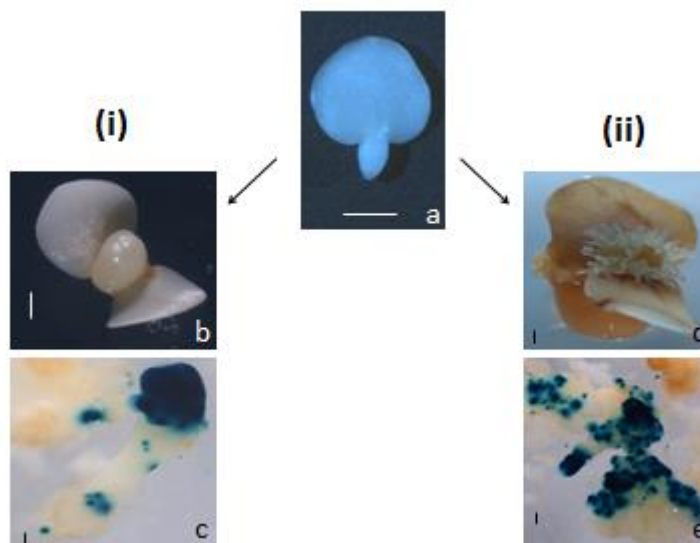


Figura 3: Estratégias para obtenção de mamoeiro transgênico usando embriogênese somática e biobalística: (i) embrião zigótico imaturo induzido por 3 semanas e (ii) embriões somáticos induzidos por 8 semanas em embriões zigóticos primários prontos para bombardeamento: a) embrião zigótico imaturo isolado da semente; b) embrião induzido com 2,4D durante 3 semanas; c) embriões submetidos ao teste do X-Gluc após bombardeamento; d) embriões somáticos no meristema apical de EZI induzidos por 8 semanas; e) embriões submetidos ao teste do X-Gluc após bombardeamento;

- Bombardeamento de embriões zigóticos (i) e embriões somáticos primários (ii) com plasmídeo pAPRNAi2:

Mais de 70% dos embriões zigóticos imaturos (i) induzidos e bombardeados com o plasmídeo pAPRNAi2, formaram embriões somáticos primários na região do meristema apical, na presença do herbicida. Também mais de 70% de embriões somáticos (ii) bombardeados também com o plasmídeo pAPRNAi2 originaram embriões somáticos secundários resistentes ao herbicida, tendo sido positivos para a presença da PAT (Fosfinotricina Acetil Transferase) usando o Imuno teste de fluxo lateral (teste da tirinha). Esses embriões transgênicos (Figuras 4 e 5) estão germinando e enraizando em meio de cultura para gerar plantas resistentes ao herbicida.

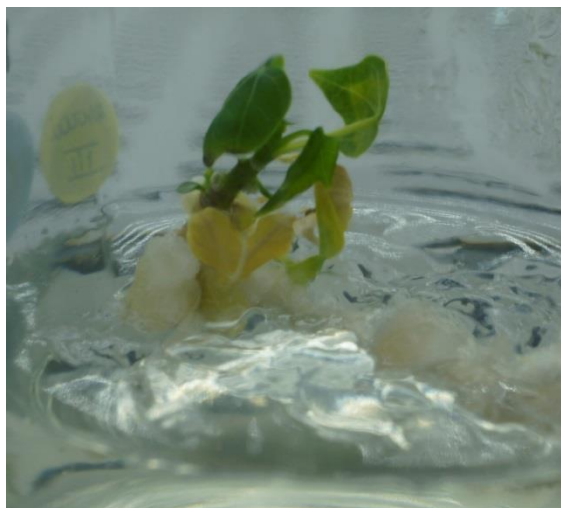


Figura 4: Plântula de mamoeiro com aproximadamente 5 centímetros de altura gerada a partir de embrião zigótico imaturo (i) bombardeado com o plasmídeo pAPRNAi2, positiva para a presença da PAT (Fosfinotricina Acetil Transferase) usando o Imuno teste de fluxo lateral (teste da tirinha), em meio de enraizamento.



Figura 5: Embriões somáticos secundários de mamoeiro obtidos a partir de embrião somático (ii) bombardeado com o plasmídeo pAPRNAi2 em processo de germinação; positivos para a presença da PAT (Fosfinotricina Acetil Transferase) usando o Imuno teste de fluxo lateral (teste da tirinha), em meio de enraizamento, com aproximadamente 4 centímetros de altura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos inferir, por meio de nossos resultados mostram que frutos com 90 a 120 dias após a polinização são melhores para a indução de embriogênese

somática com 2,4D. Também observamos que a taxa de eficiência de bombardeamento em explantes de embriões zigóticos imaturos (i) e de embriões somáticos (ii) é extremamente alta.

Os meios de indução de embriogênese somática, maturação, germinação e enraizamento in vitro do mamoeiro, estabelecidos neste trabalho foram considerados reprodutíveis e eficientes.

O protocolo utilizado para a transformação via biobalística gerou embriões resistentes ao agente seletivo. Portanto as metodologias estabelecidas de bombardeamento e embriogênese somática foram eficazes.

REFERÊNCIAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, p. 18-30, 2012.

BARBOSA, A. S.; LIN, J. C. Silenciamento de Genes Com RNA Interferência: Um Novo Instrumento para Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, vol 48, nº 5, p. 612-619, 2004.

CAI, W.Q., GONSALVES, C., TENNANT, P., FERMIN, G., SOUZA, M., SARINDY, N., JAN F.J., ZHU H. Y., & GONSALVES, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of Carica papaya L. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 35(1), p. 61-69, 1999.

CARMO, L. S. T.; JÚNIOR, M. T. S. Transformação genética de mamoeiros – 15 anos de sucesso. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/ Documentos 100, 23 p., 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Faostat. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em 18/03/2014.

GONSALVES, D. Transgenic Papaya in Hawaii and Beyond. AgBioForum, 7(1&2), p. 36-40, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 06/04/2014.

LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; SOUZA Jr., M.T.;PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. Fitopatologia Brasileira 26: 689- 702, 2001.

LIMA, S. A. A. C. Formação de calos a partir de hipocótilos de mamoeiro submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D e sacarose. Congresso Brasileiro de Fruticultura. Belém. 2003

MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J.H et al. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452: 991-996, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

NÚCLEO DE ESTUDO EM FRUTICULTURA NO CERRADO – Cultura do mamoeiro. Disponível em < www.fruticultura.iciag.ufu.br >. Acesso em 08/04/2014.

PASTERNAK, T.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VAN ONCKELEN, H.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplasts-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*, Bethesda, v. 129, p. 1807-1819, 2002.

PEREIRA, F. A.; CARNEIRO, M. R.; ANDRADE, L.M. cultura do mamão/ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 3. ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação e tecnologia, 2009. 119 p. (Coleção Plantar,65).

PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL. Rio de Janeiro, v. 38, p.1-97, 2011.

RAMASWAMY, A.; PHAP, P.D.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; KUMAR, N. Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* through Zygotic Embryo Derived Callus Culture, p. 201-208, 2010.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Eds.) Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. p. 486-496, 1997.

RODRIGUES, S. P.; LINDSEY, G. G.; FERNANDES, P. M. B. Biotechnological Approaches for Plant Viruses Resistance: From General to the Modern RNA Silencing Pathway, *Brazilian archives of biology and technology an international journal*. Vol. 52, n. 4: p.795-808, 2009.

TRINDADE, A. V. Mamão. Produção: aspectos técnicos. 1 ed. Brasília: Embrapa, p. 76, 2000.

VENTURA, A. J.; COSTA, H.; PRATES, R. S. Meleira do Mamoeiro. 2. Ed. Vitória, ES, 2004, 4 p.

ZIMMERMANN, M. J., Embriogênese somática. In: L. PEDRO BARRUETO CID (Ed). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa, 2010. p. 67- 101.